

Bevezetés

A diabétesz mellitusz (DM) a nyugati típusú társadalmak népbetegsége, amely a különböző kardiovaszkuláris szövődmények – pl. koronária ateroszklerózis, miokardiális infarktus és szívelégtelenség – következtében a megbetegedési és halálozási statisztikák egyik vezető kórképe. Régóta ismert az is, hogy a DM koronária szklerózis nélkül is okozhat kardiomiopátiát. A kórkép morfológiai-patofiziológiai hátterének felderítése az egyik legjelentősebb kutatási terület. A diabéteszes kardiomiopátia vezető tünete, hogy a szisztolés diszfunkció kifejlődését megelőzi a korán kialakuló diasztolés funkciókárosodás, melynek során a betegekben először miokardiális hipertrófia, majd dilatáció következik be. A folyamat hátterében a szívizom csökkent compliance-e és/vagy elhúzódó relaxációja állhat. Az elmúlt időszakban számos kísérlet világított rá, hogy a diabéteszes kardiomiopátia egyik központi elváltozása a szívizomsejtek Ca^{2+}_i homeosztázisának komplex zavara. A szarkoplazmatikus retikulum (SR) Ca^{2+} szekvesztráló képességének (SERCA) csökkenése vezethet a miokardium luzitróp diszfunkciójához, melyet tovább súlyosbíthat a szarkolemma Na^+ - Ca^{2+} kicserélő (NCX) mechanizmusának károsodása nehezítve a Ca^{2+} sejtből történő eltávolítását a diabéteszes szívben. A Ca^{2+}_i eltávolító mechanizmusok mellett, a Ca^{2+} felszabadító folyamatok (rianodin csatorna – RyR2) is károsodhatnak, így a miokardiális Ca^{2+}_i homeosztázisban szerepet kapó iontranszporterek és ioncsatornák működési zavarának együttes következményeképpen kialakulhat a diabéteszes szívizom Ca^{2+}_i túlterhelődése. Hosszú távon ez a Ca^{2+}_i túlterhelődés pedig kontrakciós zavarhoz, szívelégtelenség kialakulásához vezethet. Bár nagyon sok patológiai változás ismert már a miokardiális Ca^{2+}_i homeosztázis zavarával kapcsolatban DM-ben, a patomechanizmus részleteinek felderítése további jelentős erőfeszítéseket igényel.

A diabéteszes kardiomiopátiára vonatkozó kísérleti adatok többsége 1. típusú DM modellből származik, bár klinikai szempontból a 2. típusú diabétesznek (DM 2) van a legnagyobb jelentősége. Továbbá a diabéteszes Ca^{2+}_i homeosztázist érintő vizsgálatok döntően izolált kardiomiocitákon és sejt organellumokon történtek, melyekben a valós hemodinamikai funkció nehezen értelmezhető. Így fő célkitűzésünk a DM 2 progressziója során kialakuló Ca^{2+}_i homeosztázis zavarok vizsgálata volt az in vivo körülményekhez közelebb álló, különböző perfundált patkány és egér szív modellekben (szukróz gazdag diétával kiváltott DM 2 és genetikailag DM 2-es „db/db” egértörzs). Mivel a diabétesz egyik gyakori és súlyos szövődménye a hipertónia, ezért vizsgálatainkat kiterjesztettük hipertóniával kombinált DM 2 kardiomiopátiára is (fruktóz gazdag diétával kiváltott DM 2) a DM 2 átmeneti szakaszától a manifesz kardiomiopátia kialakulásáig. Emellett kiegészítő

vizsgálatokat is végeztünk DM 1-ben és egy dilatatív kardiomiopátiás transzgenetikus egér modellben is. Kísérleti rendszerünk lehetővé tette, hogy az aktuális szívpumpa funkciót jellemző hemodinamikai paramétereket és a Ca^{2+}_i homeosztázist jellemző, ún. Ca^{2+}_i -tranzienst egyidejűleg vizsgálhassuk, és ezáltal a kontrakciós tevékenység változásait a háttérben álló Ca^{2+}_i fluxusok ismeretében értelmezhesük.

Izolált szív modell

A szíveket hím, pentobarbitállal ip. altatott patkányokból illetve egerekből izoláltuk, és perfúziójukat Langendorff szerint végeztük. A 37 °C-os Krebs-Henseleit oldatot (pH=7,4) 95% O_2 + 5% CO_2 gázkeverékkel equilibráltattuk, és a perfúziót 70 Hgmm-es töltőnyomáson végeztük. A koronária áramlás mérésére a perfúziós kanülhöz kapcsolt ultrahangos áramlásmérő fejet használtunk. A bal kamrai nyomás regisztrálására ballon katétert helyeztünk a bal kamrába, melyet nyomásmérőhöz kapcsoltunk, és megfelelő jelátalakítóval a kontraktilitásra jellemző $\pm \text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ értéket számítottuk ki. 30 perces equilibrációs periódust követően a szíveket Indo-1 AM tartalmú oldattal töltöttük fel az aorta kanülhöz csatlakozó perisztaltikus pumpa segítségével, recirkulációs üzemmódban, majd az extracelluláris térben maradt Indo-1 AM festéket kimostuk. Ezután került sor a különböző kísérleti protokollok alkalmazására.

Az izolált szív Ca^{2+}_i -szint változásainak detektálására felszíni fluorometriás technikát használtunk. A fényforrás, a perfundált szív és a fluorométer fotonsokszorozó csövei közötti kapcsolatot egy randomizált, sokelemű üvegszálakból álló kvarc optikai kábel biztosította. A bal kamra epikardiális felszínét, illetve a miocitákban levő fluoreszcens festéket 340 nm-en gerjesztettük egy 100 W-os DC higanygőzlámpa segítségével. Az Indo-1 által gerjesztés hatására emittált fluoreszcenciát 400 és 506 nm (Ca^{2+} -kötött, illetve szabad Indo-1 emissziós maximuma) hullámhosszokon detektáltuk. A fényjeleket, a hemodinamikai paraméterekkel együtt rögzítettük. A 400 és 506 nm nyert jelekből megfelelő korrekciók után a szív Ca^{2+}_i -szint változásait reprezentáló 400/506 hányadost képeztük, a 400/506 fluoreszcens hányadost pedig megfelelő kalibrálás után Ca^{2+}_i -koncentráció értékekké számítottuk át. Az így kapott Ca^{2+}_i -tranzienseknek meghatároztuk a Ca^{2+}_i -felszabadító, és -szekvesztráló folyamatokat jellemző paramétereit ($\pm \text{dCa}^{2+}_i/\text{dt}_{\text{max}}$, végdiasztolés Ca^{2+}_i , Ca^{2+}_i -tranzienst amplitúdó, stb).

Metodikai fejlesztések

Korábbi kísérleteink eredményeképpen egy, a munkacsoportunk által kifejlesztett matematikai modell alkalmazásával a Ca^{2+}_i -tranziensek alapján megbecsültük a SERCA2a és

a RyR2 működését jellemző egyes kinetikai paramétereket (SERCA2a: V_{\max} , K_m ; RyR2 konduktivitás). További metodikai fejlesztéseink révén ezt a kvantitatív elemzést egészítettük ki a kereszthíd ciklus kinetikájának modellezésével izolált, kontroll és streptozotocinnal kiváltott 4 hetes diabéteszes patkányszívben. A Ca^{2+}_i és nyomás tranziensek közötti összefüggés matematikai modellezésével lehetővé vált a Ca^{2+}_i troponin C-hez való kötődésének és az ezt követő erőgeneráló kereszthíd kötésnek a jellemzése alapállapotban és beta-adrenerg stimuláció (isoproterenol) hatására. Eredményeink szerint kontroll szívekben isoproterenol csökkentette a troponin C Ca^{2+}_i szenzitivitását és növelte a kereszthíd ciklus sebességét, míg a diabéteszes szív isoproterenol válaszkészsége jelentősen csökkent jelezve a kontraktilis apparátus diszfunkcióját a diabétesz korai szakaszában, melynek hátterében valószínűleg a megváltozott miozin nehéz lánc expresszió áll. Mindez azt mutatja, hogy a matematikai modell alkalmas a kereszthíd ciklus és a kontraktilis apparátus Ca^{2+}_i szenzitivitásának vizsgálatára izolált, perfundált szív preparátumban is.

A diabéteszes kardiomiopátia során kifejlődő morfológiai és funkcionális változások in vivo nyomon követésére a laboratóriumunkban beállításra került echokardiográfiás vizsgálatok céljára egy SONOS 5500 típusú ultrahang készülék, amely kistrágcslók szívparamétereinek meghatározására alkalmas nagy frekvenciás ultrahang fejjel van ellátva. A méréseket neurolept-analgéziának alávetett, kontroll és diabéteszes patkányokon és egereken végeztük. A készülék egyaránt alkalmas, 2D, M, és Doppler üzemmódú, illetve párhuzamos EKG vizsgálatokra. Az echokardiográfiás regisztrátumok alapján meghatároztuk a bal kamrai falvastagságot, bal kamrai dimenziókat, a szisztolés funkciót leíró bal kamrai frakcionális rövidülést, ejekciós időt, és az ejekciós frakciót.

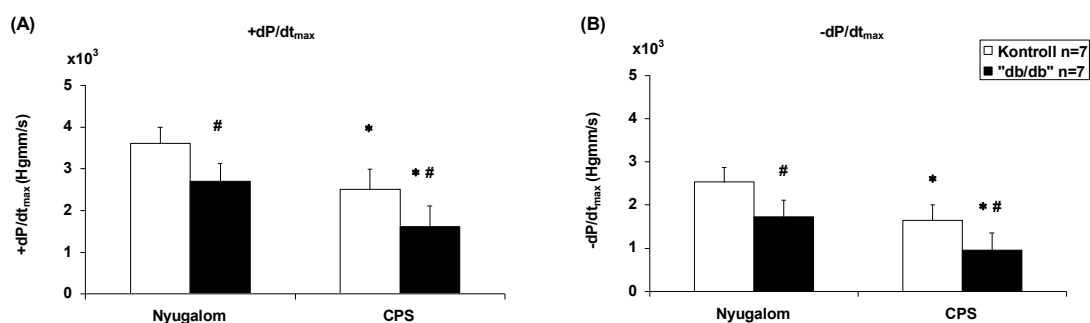
Az izolált, perfundált szív Ca^{2+}_i tranzienseinek elemzését kiegészítettük a kalcium forgalom néhány kulcs fehérjéjének – SERCA2a, RyR2, NCX, foszfolamban: PLB – expressziós szintjének Western blot-tal, illetve a fehérjék mRNS szintjeinek rt-PCR-rel történő meghatározásával is. Ezeket a vizsgálatokat dr. Bíró Tamás és munkacsoportjával (Debreceni Egyetem, Élettani Intézet) kooperációban végeztük.

A perfundált szívkiérletek végén lefagyasztott miokardiumból izolált kardiomiocitákban a kontraktilis apparátus kalcium érzékenységét határoztuk meg permeabilizált szívizomsejt preparátumokon. Ezekre a vizsgálatokra dr. Papp Zoltánnal (Debreceni Egyetem, ÁOK,

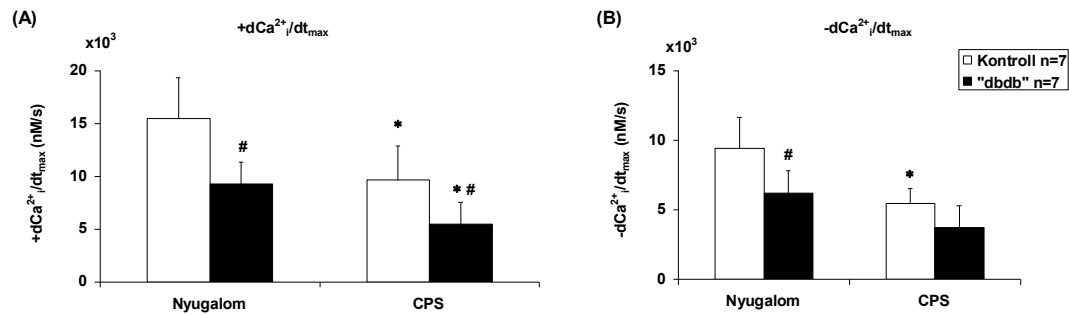
Kardiológiai Intézet, Klinikai Fiziológiai Tanszék) történő együttműködés keretében nyílt lehetőségünk.

„db/db” egértörzs

A DM 2 során kialakuló Ca^{2+}_i homeosztázist és hemodinamikai funkciót érintő zavarok tanulmányozására a leptinreceptor rezisztens „db/db” genetikailag diabéteszes egértörzset használtuk. Kontrollként a C57/BL6 egértörzs szolgált. A vizsgálatokat 6 hónapos egereken végeztük, melyekben már manifeszt kardiomiopátia jelei voltak tapasztalhatók. Az echokardiográfiás vizsgálatok egyrészt a kamrai hipertrófia jelét mutatták: [IVSd (diasztolében mért interventrikuláris szeptum vastagság, cm): K(ontroll): $0,10 \pm 0,01$ vs D(iabétesz): $0,13 \pm 0,01^*$, $*p < 0,05$], másrészt a pumpafunkciót jellemző paraméterek is csökkent kamrateljesítményre utaltak [EF (ejekciós frakció, %): K: $72,8 \pm 2,4$ vs D: $63,9 \pm 4,8^*$; FS (frakcionális rövidülés, %): K: $42,9 \pm 6,3$ vs D: $30,1 \pm 3,6^*$]. A perfundált szívekben a hemodinamikai teljesítményt és a Ca^{2+}_i tranziens változásait a nyugalmi állapot rögzítése után a SERCA2a gátló ciklopiazonsav (CPS, 5 mikromM) infúziója közben elemeztük. Nyugalmi állapotban az izolált diabéteszes szívekben az inotróp ($+dP/dt_{\max}$) és a luzitróp ($-dP/dt_{\max}$) funkció elmaradt a kontrollétól, amely különbség CPS hatására még kifejezettebbé vált (**1. ábra**). Az inotróp és luzitróp zavarok hátterében a Ca^{2+}_i -felszabadulás (rianodin csatorna funkció, $+d\text{Ca}/dt_{\max}$) és -szekvesztráció (SERCA2a funkció, $-d\text{Ca}/dt_{\max}$) zavarai voltak kimutathatók nyugalmi állapotban és CPS infúziót követően is (**2. ábra**). A továbbiakban a beta-adrenerg útvonal érintettségét is elemeztük isoproterenol (5nM) infúziójának alkalmazásával. Eredményeink azt mutatták, hogy „db/db” egerekben az izolált szívek béta-



1. ábra Kontroll (fehér) és diabéteszes „db/db” (fekete) egérszívek bal kamrai nyomásgörbéinek $+dP/dt_{\max}$ (A) és $-dP/dt_{\max}$ (B) adatai nyugalmi körülmények között és 5 mikromM SERCA gátló ciklopiazonsav (CPS) infúzió alatt. *: $p < 0.05$ Nyugalom vs. CPS; #: $p < 0.05$ Kontroll vs. „db/db” (ANOVA és Student-Neumann-Keuls *post hoc* teszt, átlag \pm SD)



2. ábra Kontroll (fehér) és diabéteszes „db/db” (fekete) egérszívek Ca^{2+} -tranzienseinek $+d\text{Ca}^{2+}_i/\text{dt}_{\text{max}}$ (A) és $-d\text{Ca}^{2+}_i/\text{dt}_{\text{max}}$ (B) adatai nyugalmi körülmények között és 5 mikrométer SERCA gátló ciklopiazonsav (CPS) infúzió alatt. *: $p < 0.05$ Nyugalom vs. CPS; #: $p < 0.05$ Kontroll vs. "db/db" (ANOVA és Student-Neumann-Keuls *post hoc* teszt, átlag \pm SD)

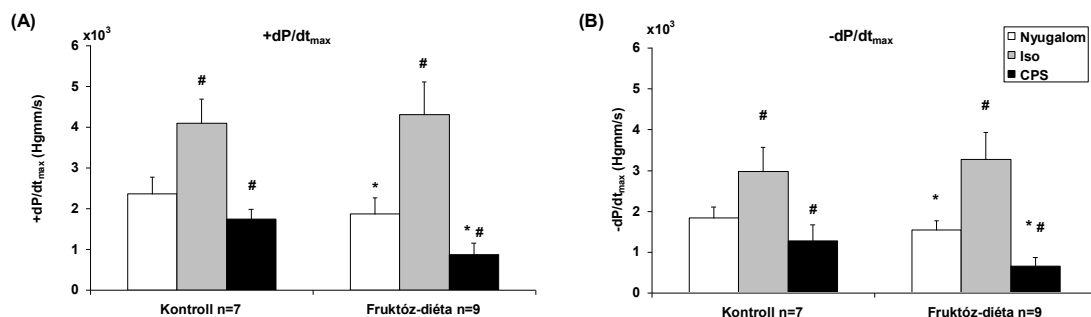
agonista isoproterenolra adott válaszkészsége mind a szívfrekvencia, mind a $\pm dP/\text{dt}_{\text{max}}$ illetve $\pm d\text{Ca}/\text{dt}_{\text{max}}$ paraméterek tekintetében elmaradt a kontroll értékektől. Mindezek az eredmények azt jelzik, hogy a csökkent szívfunkció (inotrópia, luzitropia) hátterében az SR Ca^{2+} szekvesztráló és így felszabadító működésének károsodása állhat. Ezek az eredmények megerősítést nyertek a Ca^{2+} -tranzienst szabályozó fehérjék szintjeinek meghatározásával, melyek szerint a „db/db” egerekben változatlan SERCA2a szint mellett fokozódott a pumpa működését gátló PLB expressziója, ami a SERCA2a funkció csökkenését vonja maga után.

Fruktóz-indukált diabéteszes patkány

A fruktóz gazdag diétával kiváltott DM 2. a hipertóniával társuló diabétesz kardiális következményeinek vizsgálatára alkalmas modell. Ebben a kísérletsorozatban a DM átmeneti (6 hetes fruktóz etetés) és manifeszt szakaszában (10 hetes fruktóz etetés) kialakuló kontraktilis funkcionális eltéréseket és miokardiális Ca^{2+}_i homeosztázis zavarokat elemeztük Sprague-Dawley (SD) patkányokban. Az izolált, perfundált szív kísérleteket kiegészítettük in vivo echokardiográfiás vizsgálatokkal, orális glukóz terheléssel (oGTT), a Ca^{2+}_i homeosztázis kulcsfehérjéinek Western blot analízisével és a kontraktilis apparátus izolált permeabilizált kardiomiocitákon történt kalcium érzékenységének meghatározásával. A 6 hetes csoportban az artériás középnyomás emelkedése [P_{mean} (Hgmm): K: $86,5 \pm 7,5$ vs D: $122 \pm 7,1^*$, $*p < 0,05$], pozitív glukóz-tolerancia teszt, a kamrai szeptum megvastagodása volt megfigyelhető [IVSd (cm): K(ontroll): $0,19 \pm 0,01$ vs D(iabétesz): $0,24 \pm 0,01^*$]. Echokardiográfiával nyugalmi körülmények között nem találtunk kardiális diszfunkciót [EF (%): K: $76,8 \pm 2,4$ vs D: $73,6 \pm 1,3$; FS (%): K: $48,5 \pm 11,2$ vs D: $49,9 \pm 3,5$]. Az izolált diabéteszes szívek hemodinamikai teljesítménye nyugalmi körülmények között szintén nem tért el a kontroll szívektől, de a

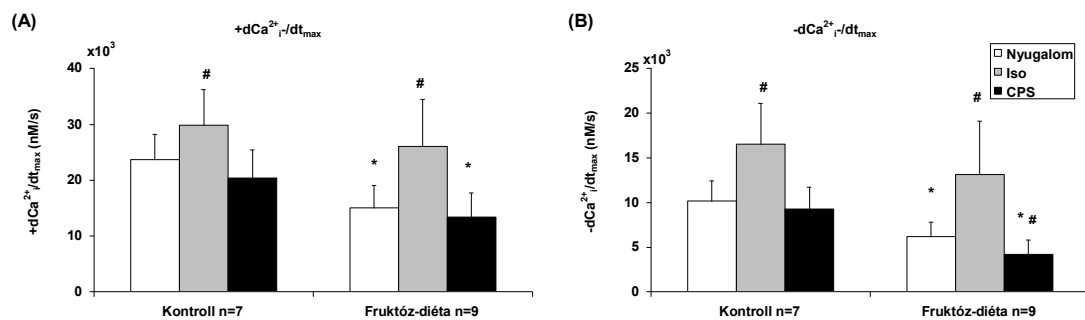
Ca^{2+}_i -tranziens elemzése a fruktóz-diétás csoportban lassult Ca^{2+}_i -szekvesztrációt mutatott már nyugalomban is [$-\text{dCa}/\text{dt}_{\text{max}}$ (nM/s): K:11507 \pm 1583 vs. D:8363 \pm 606*].

A 10 hetes csoportban már egyértelművé váltak echokardiográfiával a csökkent pumpafunkció jelei [EF (%): K:78,2 \pm 5,4 vs D:54,6 \pm 8,2*], illetve izolált szívben bazális körülmények között is kimutatható volt az inotróp és luzitrop zavar (3. ábra). Ezzel párhuzamosan lassult Ca^{2+} -felszabadulás és - szekvesztráció volt megfigyelhető (4. ábra). Az eredmények mindkét korcsoportban a SERCA2a funkció hanyatlására utaltak, így a SERCA2a működés részletesebb elemzése érdekében megvizsgáltuk a hemodinamikai funkciót és a Ca^{2+}_i homeosztázist béta-agonista isoproterenol (ISO, 5 nM), és SERCA2a gátló ciklopiazonsav (CPS, 5 mikromM) infúziós alkalmazásával. Isoproterenol hatására a diabéteszes szívek fokozott béta-adrenerg választ adtak a $\pm\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ paraméterek tekintetében (3. ábra), de a szívfrekvencia-fokozódás mértéke megegyezett a kontrollal. CPS hatására a fruktóz-diétás állatok szíveiben a Ca^{2+} -szekvesztráció sebességének ($-\text{dCa}/\text{dt}_{\text{max}}$) fokozott csökkenése volt megfigyelhető (4. ábra). Az alacsony dózisú SERCA2a gátló iránti fokozott érzékenysége a SERCA2a funkció sérülésére utal (3. és 4. ábra).



3. ábra Kontroll és fruktóz dús diétán tartott diabéteszes patkányszívek bal kamrai nyomásgörbéinek $+\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ (A) és $-\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ (B) adatai nyugalmi körülmények között (fehér); 5 nM béta-agonista izoproterenol (szürke, Iso); illetve 5 mikromM SERCA gátló ciklopiazonsav (fekete, CPS) infúzió alatt. *: $p < 0,05$ kontroll vs. fruktóz; #: $p < 0,05$ Iso vagy CPS vs. nyugalmi érték (ANOVA és Student-Neumann-Keuls *post hoc* teszt, átlag \pm SD)

Eredményeink szerint a sérült szívfunkció kompenzálására fokozott béta-adrenerg válaszkészség alakul ki, ami elsősorban a SERCA2a működésének serkentésén keresztül érvényesül. A Ca^{2+}_i -tranziens kialakításáért felelős kulcsfehérjék expresszióját elemezve azt tapasztaltuk, hogy a 6 hetes diabéteszes szívekben a foszforilált-PLB és az NCX, míg a 10 hetes diabéteszes szívekben a foszforilált-PLB és a SERCA2a szintje nőtt a kontroll szívekhez képest. Ugyanakkor izolált, permeabilizált kardiomiocitákon történt mérések szerint a kontraktilis apparátus Ca^{2+} érzékenysége nem változott



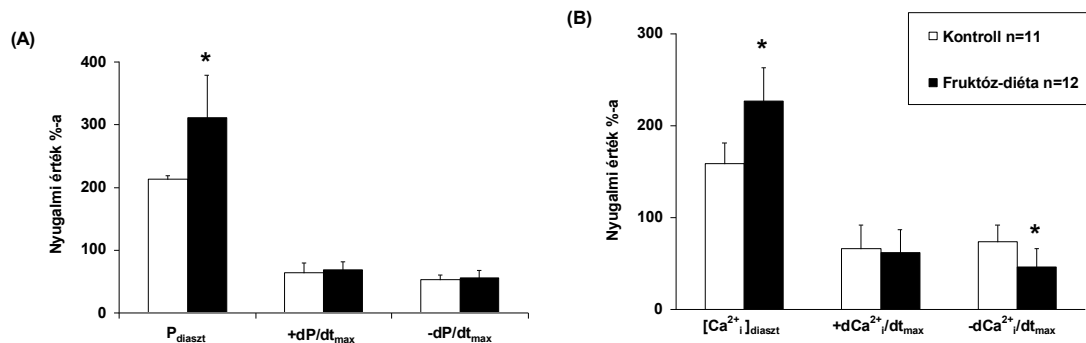
4. ábra Kontroll és fruktóz dús diétán tartott diabéteszes patkányszívek Ca^{2+}_i -tranzienseinek $+\text{dCa}^{2+}_i/\text{dt}_{\text{max}}$ (A) és $-\text{dCa}^{2+}_i/\text{dt}_{\text{max}}$ (B) adatai nyugalmi körülmények között (fehér); 5 nM béta-agonista izoproterenol (szürke, Iso); illetve 5 mikrométer SERCA gátló ciklopiazonsav (fekete, CPS) infúzió alatt. *: $p < 0,05$ kontroll vs. fruktóz; #: $p < 0,05$ Iso vagy CPS vs. nyugalmi érték (ANOVA és Student-Neumann-Keuls *post hoc* teszt, átlag \pm SD)

egyik csoportban sem. Mindezek alapján megállapítható, hogy a manifeszt kardiális diszfunkciót megelőzően már sérül a SERCA2a működése, mely így alapvető etiológiai szerepet játszik a fruktóz-indukált diabéteszes kardiomiopátia kialakulásában. Ennek a diszfunkciónak a mechanizmusa lehet a SERCA2a posztranszlációs modifikációja vagy a membránkörnyezet kedvezőtlen változása. A funkciózavar ellensúlyozására a diabéteszes szívekben beta-adrenerg aktiváció, valamint a SERCA2a és NCX fehérjék fokozott expressziója következik be.

Hipoxia hatása fruktóz-indukált diabéteszben

Jól ismert, hogy a diabéteszes szív különböző megterhelések, stressz helyzetekkel szembeni tűrőképessége korlátozott mértékű. A fruktóz-indukált diabéteszes szív csökkent adaptációs képességében a SERCA2a funkció sérülése alapvető szerepet játszhat, ezért megvizsgáltuk, hogy a Ca^{2+}_i homeosztázist jellemző Ca^{2+}_i -tranziens paraméterei hogyan változnak a diabéteszes szívben hipoxia hatására. A kísérleteket 10 hét fruktóz gazdag diétán tartott SD patkányokból izolált szíveken végeztük. A Ca^{2+}_i -tranziens és a hemodinamikai állapot nyugalmi értékeinek rögzítése után a szíveket 95% N_2 + 5% CO_2 gázkeverékkel equilibráltatott Krebs-Henseleit oldat perfúziójának tettük ki. A 10 perces hipoxiás inzultust 20 perces poszthipoxiás perfúzió követte. Hipoxia hatására a diabéteszes szívekben a végdiasztolés nyomás szignifikánsan jobban megemelkedett (**5A. ábra**). A nyugalomban is tapasztalható csökkent inotrópia és luzitropia hipoxia alatt is megfigyelhető volt, de mindkét paraméter hasonlóan változott hypoxia hatására a kontroll és diabéteszes csoportban is (**5A.**

5. ábra). A diabéteszes szívekben a Ca^{2+}_i szekvesztráció csökkenésének mértéke kifejezettebb volt a hipoxia során (**5B. ábra**). A végdiasztolés nyomás diabéteszes szívekben tapasztalt



5. ábra Kontroll (fehér) és fruktóz dús diétán tartott diabéteszes patkányszívek (fekete) hemodinamikai (A) és Ca^{2+}_i -tranzien (B) paramétereinek hypoxia során mért adatai a prehypoxiás értékek százalékában. *: $p < 0,05$ kontroll vs. fruktóz (kétmintás T-próba, átlag \pm SD)

emelkedésének hátterében tehát a hipoxia hatására kialakuló csökkent Ca^{2+}_i szekvesztráció és ennek következtében kialakuló magasabb végdiasztolés Ca^{2+}_i szint áll. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a fruktóz-indukált diabéteszes szívben a SERCA2a diszfunkció miatt csökkent Ca^{2+}_i szekvesztráció hipoxiára fokozottan érzékeny, amely oxigénhiányos állapotokban kifejezettebb szívfunkció romlást és a Ca^{2+}_i szint túlzott mértékű emelkedését okozhatja.

Szukróz-indukált diabéteszes patkány

Irodalmi adatok alapján a szukróz dús diéta alkalmas DM 2. indukciójára. A betegség szövödményei a diéta 8. hetétől manifesztálódnak, és a kialakuló diabétesz az esetek többségében nem társul hipertóniával. Így a modell alkalmazásával nyert adatok jól kiegészíthetők és segíthetnek a fruktóz-táplált modellünkön megfigyelt elváltozások értelmezését, hiszen ott a kísérletes diabétesz magas vérnyomással szövődik. Vizsgálatainkhoz 5 hetes hím SD patkányokat 12 hétig olyan táppal tápláltunk, melyben a tápérték 70%-át szukróz tette ki. A diétás periódus leteltével a korábban ismertetett vizsgálatokat végeztük el: így vérnyomásmérés, echokardiográfia, vércukor-szint mérése, oGTT elvégzése, és izolált szív kísérletek zajlottak a patkányokon. Bár a szukróz táplált patkányok súlya jelentősen meghaladta a kontroll állatokét a diétás periódus végén, nem tapasztaltunk eltérést az éhomi vércukorszintjükben, és az oGTT elvégzése során is hasonló glükóz-terhelési görbéket nyertünk, mint a kontroll állatokban. Vérnyomásuk, és az echokardiográfias vizsgálatok során mért bal kamrai dimenziók, illetve dinamikus paraméterek sem különböztek a kontroll állatokétól. Az izolált szív kísérletekben a nyugalmi

állapotban mért bal kamrai hemodinamikai paraméterek, és Ca^{2+}_i -tranziens jellemzők nem tértek el a kontroll értékektől. A kísérletek során még teszteltük az izolált szívek béta-adrenerg válaszkészségét béta-agonista isoproterenol infúziójával, illetve a vizsgáltuk a szívek hipoxia tűrését. A szukróz táplát állatok szívei mindkét esetben hasonló módon reagáltak a kontrollokhoz. A modellben tehát az általunk alkalmazott vizsgálómódszerekkel sem a 2-es típusú diabétesz kifejlődését, sem az esetleges szívszövődmények kialakulását nem sikerült igazolnunk. A további vizsgálódást (Western-blot, permeabilizált kardiomiocita kísérletek) a fenti negatív eredmények ismeretében felfüggesztettük.

A miokardiális pH_i változása diabéteszben

Érdekes kérdésnek tartottuk, ezért külön kísérlet-sorozatban vizsgáltuk, hogy a kezeletlen 1-es típusú diabéteszt jellemző ketozis következtében kialakuló extracelluláris acidózis milyen hatással van a szívműködés intracelluláris pH szabályozására, hiszen az intracelluláris pH-homeosztázis kis mértékű kilengése is jelentősen befolyásolja a szív kontraktilis funkcióit. Kísérleteinkben streptozotocinnal kezelt 1-es típusú diabéteszes hím SD patkányok szíveit vizsgáltuk a kezelés után 6 héttel. Az izolált szív kísérletekben az intracelluláris pH változásait követtük nyomon SNARF-1 fluoreszcens pH-indikátor alkalmazásával [excitáció: 510 nm; emisszió: 580 nm (protonált), illetve 640 nm (deprotonált); 580/640 hányados változása a pH változást jellemzi]. A kísérleti protokoll során a 7.4 pH-jú perfúziós folyadékkal történő inkubáció után a perfúziót 7.0 pH-jú oldattal folytattuk. Majd a sejt pH-szabályozásának egyik kulcstranszporterét, a Na^+/H^+ cserélőt EIPA-val (5(N-Ethyl-N-isopropil) amilorid – 1mM) gátoltuk, és a perfúziós protokollt megismételtük. Az intracelluláris pH-változások dinamikájának részletes matematikai elemzése még zajlik, de előzetes számításaink szerint a 7.4 pH-jú perfúzió során az ic. pH nem tért el a diabéteszes és kontroll szívekben. A savas extracelluláris milliő az intracelluláris pH átmeneti savasodását okozta. A savasodás a diabéteszes szívekben kisebb mértékű volt, és hamarabb visszatért a kiindulási értékre. EIPA alkalmazása során a szívek lassabban alkalmazkodtak a savas perfúzió által kiváltott pH-változáshoz, illetve a kontroll és diabéteszes szívek között alapállapotban megfigyelt különbség eltűnt.

Eddigi eredményeink azt sugallják, hogy a diabéteszes szívek könnyebben alkalmazkodnak az extracelluláris pH hirtelen változásaihoz, az alkalmazkodási mechanizmus feltételezhetően a Na^+/H^+ cserélő fokozott működése. Annak eldöntésére, hogy a fokozott működést az enzim szintjének megváltozása, vagy funkcionális aktivációja okozza-e, a

vizsgálatokat még a Na^+/H^+ cserélő enzimszintjének meghatározásával fogjuk kiegészíteni a közeljövőben.

A szöveti inzulin érzékenység fokozásának hatása a miokardiális Ca^{2+}_i homeosztázisra

Viszonylag új terápiás eszköz a DM 2 kezelésében a PPARgamma agonista tiazolidendionok alkalmazása. A gyógyszercsoport az inzulin érzékenység fokozásával fejti ki hatását. Nem vizsgálták még, hogy a miokardiális Ca^{2+} -homeosztázis diabéteszben megfigyelt elváltozásait. Célunk ennek felderítése volt kísérletes állatmodellen. A vizsgálatot DM 2-es „db/db” egereken végeztük 6 hónapos korban. Az állatok 4 hónapos koruktól 5mg/ttkg/nap terápiás dózisban PPAR gamma agonista roziglitazon kezelésben részesültek. A gyógyszert a tápba keverve adagoltuk. A kísérleti protokoll minden lépésében megegyezett a „db/db” egértörzsön korábban alkalmazottal. A roziglitazon terápia nem befolyásolta az „db/db” állatok antropometriai jellemzőit; a vércukorszintet jelentősen csökkentette, de nem normalizálta. Echokardiográfiával a pumpafunkció, izolált szív kísérleteinkben az inotróp ($+\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$) és a luzitróp ($-\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$) funkció javulását mutattuk ki. A Ca^{2+} -tranziensek elemzése nem tükrözte egyértelműen ezt a változást. A Ca^{2+}_i -felszabadulás ($+\text{dCa}/\text{dt}_{\text{max}}$) és -szekvesztráció ($-\text{dCa}/\text{dt}_{\text{max}}$) zavarai a „db/db” egerekben roziglitazon terápiát követően is változatlanul megfigyelhetők voltak. A kezeletlen „db/db” egerekben mért magas végdiasztolés Ca^{2+} -koncentráció azonban jelentősen mérséklődött. A kezelt állatok béta-agonista isoproterenolra adott válaszai közelítették a kontrollokét, tehát a „db/db” egerekben megfigyelt csökkent béta-adrenerg válaszkészség nem fejlődött ki. Az adatok pontos értelmezéséhez elengedhetetlen a Ca^{2+} -transzporterek enzimszintjének ismerete, ennek meghatározása még folyamatban van.

Ca^{2+}_i homeosztázis változások dilatatív kardiomiopátiában

Egy korábban elkezdett vizsgálat sorozatot lezárva a szívelégtelenség során létrejövő miokardiális Ca^{2+}_i homeosztázis változásait tanulmányoztuk a dilatatív kardiomiopátia modelljéül szolgáló MLP-KO transzgenetikus egértörzsben. A néhány hónapos egereket az izom Lim fehérje (MLP) hiányában kialakuló dilatatív kardiomiopátia patofiziológiájának vizsgálatára alkalmazzák. Ugyanakkor a KO egerek felnőttkorig tapasztalható hosszú túlélésére nincs kellő magyarázat, hiszen a genetikai defektus korán kialakuló szívelégtelenséget okozva halálra predesztinálja őket. Feltételezésünk szerint a jelenségre a miokardiális Ca^{2+}_i homeosztázisban bekövetkező életkor függő adaptív változások szolgálhatnak magyarázatképpen, amely megvédi a felnőtt egereket a manifeszt

kardiomiopátia és szívelégtelenség kifejlődésével szemben. A kísérletsorozatban 3 és 6 hónapos MLP-KO és korazonos kontroll egerekből izolált szívekben vizsgáltuk a hemodinamikai teljesítményt a Ca^{2+}_i homeosztázis függvényében. A szívfunkciót a beta-agonista isoproterenol (5 nM) és a SERCA2a gátló ciklopiazonsav (CPS, 5 mikromM) infúziójával teszteltük. Továbbá, a Ca^{2+}_i homeosztázisban szerepet játszó csatornák és transzporterek – RyR2, SERCA2a és NCX – kardiális mRNS és fehérje szintjeit is meghatároztuk rt-PCR és Western blot technikákkal. Nyugalmi állapotban a 3 hónapos KO egerekben a luzitóp funkció ($-\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$) csökkenése volt tapasztalható, amely nem volt megfigyelhető a 9 hónapos KO egerekben (**1. táblázat**). A beta-adrenerg válaszkészség

	3 hónapos		9 hónapos	
	Kontroll (n=6)	MLP-KO (n=7)	Kontroll (n=6)	MLP-KO (n=9)
(a) Nyugalom				
Végdiasztolés P (Hgmm)	9.0 ± 0.3	9.6 ± 0.5	9.2 ± 0.4	10.1 ± 0.2
+ $\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ (Hgmm/s)	3312 ± 125	3110 ± 148	2972 ± 176	3189 ± 190
- $\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ (Hgmm/s)	1784 ± 67	1489 ± 65*	1520 ± 118	1635 ± 121
(b) 5.0 μM CPS				
Végdiasztolés P (Hgmm)	10.3 ± 1.1	17.8 ± 1.5*,#	10.3 ± 0.8	11.4 ± 1.3
+ $\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ (Hgmm/s)	2394 ± 282#	1271 ± 137*,#	1874 ± 122 #	1607 ± 115 #
- $\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ (Hgmm/s)	965 ± 132#	506 ± 53*,#	598 ± 68 #	585 ± 50 #

1. táblázat Kontroll és MLP-KO egérszívek hemodinamikai paraméterei nyugalmi körülmények között (a); illetve 5 mikromM SERCA gátló ciklopiazonsav (b) infúzió alatt. P: bal kamrai nyomás *: $p < 0,05$ kontroll vs. MLP-KO; #: $p < 0,05$ CPS vs. nyugalmi érték (ANOVA és Student-Neumann-Keuls *post hoc* teszt, átlag ± SEM)

mindegyik kísérleti csoportban hasonló volt. A 3 hónapos KO egérszívekben CPS szignifikánsan növelte a végdiasztolés Ca^{2+}_i szintet és csökkentette az SR Ca^{2+}_i szekvesztráló kapacitását ($-\text{dCa}^{2+}/\text{dt}_{\text{max}}$) a korazonos kontroll egerekhez képest, amely – a Ca^{2+}_i homeosztázis szempontjából – kedvezőtlen változások 9 hónapos egérszívek és korazonos kontrolljaik viszonylatában már nem voltak tapasztalhatóak (**2. táblázat**). A SERCA2a mRNS szintje szignifikánsan kisebb volt a 3 hónapos KO szívekben, mint a korazonos kontroll szívekben, amely különbség 9 hónapos korra a KO és kontroll egerek között eltűnt.

Továbbá, a 9 hónapos szívekben a SERCA2a mRNS expresszió szignifikánsan nőtt a 3 hónapos KO egerekhez képest. Hasonló változásokat tapasztaltunk a SERCA2a fehérje

	3 hónapos		9 hónapos	
	Kontroll (n=6)	MLP-KO (n=7)	Kontroll (n=6)	MLP-KO (n=9)
(a) Nyugalom				
Végdiasztolés $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	83 ± 4	95 ± 8	71 ± 6	87 ± 3
+ $d[Ca^{2+}]_i / dt_{max}$ (nM/s)	22.2x10 ³ ±13x10 ²	22.4x10 ³ ±14x10 ²	22.9x10 ³ ±11x10 ²	23.1x10 ³ ±10x10 ²
- $d[Ca^{2+}]_i / dt_{max}$ (nM/s)	11.4x10 ³ ±15x10 ²	9.6x10 ³ ±6x10 ²	10.5x10 ³ ±10x10 ²	8.8x10 ³ ±8x10 ²
(b) 5.0 μM CPS				
Végdiasztolés $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	176 ± 16 #	322± 35 ^{*,#}	199 ± 37 #	242 ±18 [#]
+ $d[Ca^{2+}]_i / dt_{max}$ (nM/s)	17.4x10 ³ ±15x10 ^{2#}	15.6x10 ³ ±19x10 ^{2#}	15.7x10 ³ ±10x10 ^{2#}	22.0x10 ³ ±23x10 ²
- $d[Ca^{2+}]_i / dt_{max}$ (nM/s)	8.7x10 ³ ±18x10 ²	5.8x10 ³ ±9x10 ^{2#}	10.3x10 ³ ±12x10 ²	9.6x10 ³ ±14x10 ²

2. táblázat Kontroll és MLP-KO egérszívek Ca^{2+}_i -tranziens paraméterei nyugalmi körülmények között (a); illetve 5 mikrométer SERCA gátló ciklopiazonsav (b) infúzió alatt. *: $p < 0,05$ kontroll vs. MLP-KO; #: $p < 0,05$ CPS vs. nyugalmi érték (ANOVA és Student-Neumann-Keuls *post hoc* teszt, átlag±SEM)

szintjeit elemezve is, vagyis a 3 hónapos KO szívek korazonos kontrollhoz képest csökkent SERCA2a fehérje szintje a 9 hónapos KO és korazonos kontroll szívek közötti összehasonlításban már nem volt megfigyelhető. Mindez azt jelzi, hogy a 9 hónapos korra a KO egérszívekben a SERCA2a mind mRNS mind fehérje szinten normalizálódott. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a felnőtt fenotípusú MLP-KO egérszívekben életkor függő kompenzatórikus mechanizmusok felelősek a kezdeti Ca^{2+}_i homeosztázist érintő zavarok kiküszöböléséért, amelyek megakadályozzák a szív hemodinamikai funkcióinak szívelégtelenséghez vezető romlását, és így a felnőtt egerek túlélését biztosítják.

Az eredmények tudományos megjelenítése

Az OTKA periódus alatt 2 közlemény jelent meg nemzetközi folyóiratokban és 1 további közlemény „minor” revízió alatt áll. A témakörben végzett kutatási eredményekből további 3 közlemény van előkészületben, amelyek megvalósításában a pályázathoz a periódus második felében csatlakozott Kollai Márk és Koller Ákos egyetemi tanárok is részt vesznek. Kutatási eredményeinkről 7 nemzetközi és hazai tudományos konferencián számoltunk be, amelyek

összefoglalói nemzetközi folyóiratokban vagy konferencia kiadványokban jelentek meg. Az OTKA pályázat eredményeképpen a pályázat témaköréből van készülőben egy PhD disszertáció. Végül, TDK hallgatóink összesen 8 előadással szerepeltek a pályázati periódusban TDK konferenciákon, amelyeken 2 első és 3 harmadik helyezést értek el.